

血小板フィブリノゲン受容体インテグリン α IIb β 3 活性化制御機構の解明

加藤 恒

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科

【研究の背景】

血小板は出血時の止血において中心的役割を果たしているが、高齢化に伴い増加している心筋梗塞、脳卒中など動脈血栓症にも大きな関わりを持っている。血栓形成では血小板のフィブリノゲンを介した凝集が見られるが、この時フィブリノゲンは血小板表面受容体インテグリン α IIb β 3(GPIIb-IIIa)に結合する。 α IIb β 3 は血中を循環する血小板では非活性化状態にあるが、アゴニスト刺激後に誘導される立体構造変化でフィブリノゲンとの親和性が高まり凝集形成に至る。この活性化状態を制御するのが「inside-out シグナル」で、この厳密な制御が生体内での病的血栓を作ることなく止血を行うために必須である。Inside-out シグナルでは、まず CalDAG-GEFI(RasGRP2)が Rap1 の活性化を誘導。その後、Talin と Kindlin-3 が β 3 細胞内領域に結合し α IIb β 3 が活性化することが知られている。しかし、血小板は骨髄巨核球細胞質断片から作られるため無核であり、遺伝子導入や培養といった実験手法に大きな制約があり inside-out シグナルの詳細についてまだ十分に解明は行われていない。

我々はこれまで多くの血小板機能異常症例の血小板を用いた inside-out シグナル解明の試みから、生体内での血栓形成に α IIb β 3 活性化の単純な ON/OFF ではなく、速やか、かつ持続的な α IIb β 3 活性化が重要であることを提唱してきた。

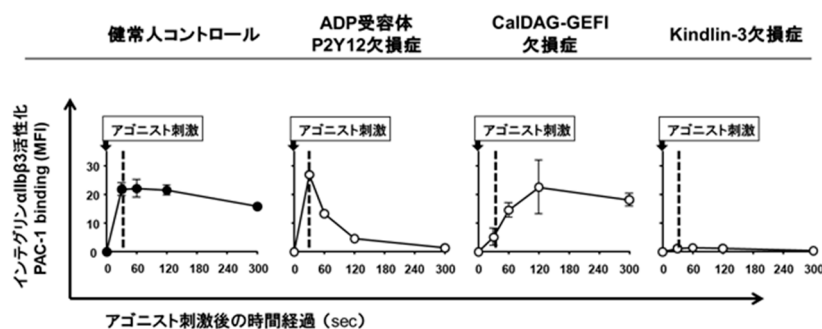
【目 的】

本研究では、我々がこれまでの血小板機能異常症解析より得られた知見である α IIb β 3 活性化キネティクスの重要性をターゲットとすることでinside-outシグナルによる α IIb β 3活性化の詳細を明らかとし、新規抗血小板療法、先天性血小板機能異常症における出血コントロール法の開発へとつなげていくことを目的とする。

【方 法】

- (1) 健常人、および血小板機能異常症例より得た血小板を用いて α IIb β 3 活性化キネティクスを解析する。
- (2) 巨核球系細胞株 CMK 細胞システムに健常人血小板 RNA より作製した cDNA ライブラリー、またはshRNA ライブラリーを導入し、 α IIb β 3 活性化キネティクスに関与する分子の探索を行う。
- (3) 血小板機能異常症例の血小板を用いた質量分析による蛋白解析で α IIb β 3 活性化キネティクスに関与する分子の探索を行う。

【結 果】

血小板インテグリン α IIb β 3活性化の経時的変化

- (1) 血小板機能異常症例血小板でアゴニスト刺激後に誘導される α IIb β 3活性化キネティクスを解析し、生体内での止血にとって α IIb β 3の速やかな活性化、かつ持続的活性化が必要であることを明らかとした。
- (2) CMK細胞への血小板cDNAライブラリー導入を行い、フローサイトメトリーを用いた α IIb β 3活性化キネティクス解析で変化を生じるクローンの抽出を行った。現在クローンに導入されている分子がinside-outシグナルへ与える影響について検討を進めている。
- (3) 健常人、血小板機能異常症例の血小板を用いて、ある条件下で抽出した2,881個のペプチド断片について質量分析による解析を行った。こちらに関しても現在inside-outシグナルとの関連について詳細な検討を進めている。

【考 察】

α IIb β 3異常症であるGlanzmann血小板無力症において見られる出血症状より、フィブリノゲン受容体 α IIb β 3の止血における重要性は認識されているものの、血小板特有の実験手法の制約もあり α IIb β 3の機能の詳細についての解析は進んでいない。今回行っている検討は α IIb β 3活性化の経時的変化という新たな着眼点に基づいており、さらに検討を続けていくことで α IIb β 3活性化メカニズムの詳細を明らかにできると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、様々な出血症状を呈する血小板機能異常症例に基づいたものであり、得られる知見は生理的意義が非常に高いものであることが考えられる。新規の抗血小板薬の開発、血小板機能異常症における出血コントロール法の開発に結びつくことが予想され、臨床の現場へ大きく貢献するものと考えられる。

【参考・引用文献】

1. Kato H, Nakazawa Y, Kurokawa Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Morita D, Banno F, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Human CalDAG-GEFI deficiency increases bleeding and delays α IIb β 3 activation. *Blood* 2016; 128: 2729-2733.
2. Nakazawa T, Tadokoro S, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for α IIb β 3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Exp Hematol* 2013; 41: 79-90.
3. Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Critical role of ADP interaction with P2Y12 receptor in the maintenance of α IIb β 3 activation: association with Rap1B activation. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1379-1387.
4. Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Impaired platelet function in

a patient with P2Y₁₂ deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2315-2323.